

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 522 150

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 14903

(54) Dispositif pour la détection quantitative de réactions biochimiques.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). G 01 N 21/64, 21/76, 33/58.

(22) Date de dépôt..... 31 août 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée.: DE, 23 février 1982, n° P 32 06 607.1.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 34 du 26-8-1983.

(71) Déposant : Société dite : GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN- UND UMWELTFORSCHUNG
MBH. — DE.

(72) Invention de : Peter Hösli, Herbert Schneckenburger, Eberhard Unsöld et Winfried Lührs.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Bert, de Keravenant et Herrburger,
114, bd Haussmann, 75008 Paris.

D

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

1

" Dispositif pour la détection quantitative de réactions biochimiques ".

L'invention concerne un dispositif pour
5 la détection quantitative de réactions biochimiques, en
particulier enzymatiques, dans le cas de durées réduites
de mesure, avec une détermination de fluorophores natu-
rels et/ou artificiels comme produit réactionnel, le
produit réactionnel étant soumis à un rayonnement lumi-
10 neux et le rayonnement fluorescent dégagé par le produit
étant capté et évalué.

On connaît un dispositif de mesure
pour la détermination des échanges de substrats fluoro-
gènes dans la cellule par fluorométrie d'impulsion en
15 circulation (Biotechnische Umschau 3, Cahier 7, (1979),
pages 214 et suivantes), où les cellules sont conduites
par concentration hydrodynamique, séparément les unes
après les autres, à travers le rayon d'un laser à raie
continue. Les produits fluorophores sont excités par
20 fluorescence dans la cellule, et émettent un rayon de
fluorescence, qui forme, en traversant l'intervalle de
mesure, l'impulsion lumineuse fluorescente à évaluer,
qui est proportionnelle à la masse des fluorophores. Ce
procédé ne permet qu'une mesure unique des cellules, on
25 ne peut donc pas suivre le déroulement des réactions

dans les cellules individuelles.

On connaît également un test basé sur une détermination fluorométrique, par microfluorométrie (Microchimica Acta (Wien) 177 II, 379-388). Cette détermination comporte une limite de détection inférieure de 5×10^{-14} mole de NADPH et n'est pas fonction du temps. Elle n'est pas appropriée à la détermination de faibles échanges réactionnels au niveau de la cellule, ni à déceler des cinétiques réactionnelles élevées.

L'invention a donc pour objectif de trouver un dispositif, qui permette d'effectuer la détection fluorométrique avec une sensibilité élevée et de réduire le seuil de déclenchement du nombre de molécules d'enzymes, avec une durée de mesure de l'ordre de la seconde ; cela permet, d'une part, de détecter des cinétiques de réaction élevées, et, d'autre part, de réaliser un nombre élevé d'échantillons par unité de temps.

A cet effet, l'invention propose un dispositif caractérisé en ce que : a) l'excitation optique du produit réactionnel s'effectue par impulsions lumineuses, b) il est prévu un comptage des photons en fonction du temps, avec suppression du bruit de fond et une séparation des signaux de mesure de la lumière dispersée et la luminescence perturbatrice, en vertu du comportement d'amortissement en fonction du temps, et c) l'excitation et le comptage des photons sont synchronisés.

Un développement avantageux de l'invention permet que l'excitation optique s'effectue dans le domaine visible et/ou ultraviolet, au moyen d'un laser dont la récurrence élevée d'impulsions peut être réduite par sélection d'impulsions, à l'aide d'un obturateur électro-optique réglable.

Ainsi, l'utilisation selon l'invention du procédé de comptage des photons en fonction du temps

permet aussi bien d'effacer le bruit de fond, que de séparer les signaux de mesure de la lumière dispersée et des perturbations luminescentes, en raison du comportement d'affaiblissement en fonction du temps. D'autre
5 part, l'invention permet de remplir les conditions suivantes pour la mise en oeuvre du procédé de comptage des photons destiné à détecter les réactions biochimiques:

- 10 - possibilité de focalisation optimale de la source lumineuse d'excitation dans un domaine inférieur au micro,
- mise en oeuvre d'une source lumineuse avec un nombre élevé d'impulsions d'excitation ($\geq 10^5$) en l'espace d'une période de mesure de quelques secondes ; c'est ainsi seulement que l'on peut additionner un nombre
15 suffisant de photons de fluorescence, avec une bonne statistique des photons individuels (selon la répartition de Poisson),
- il est possible d'exploiter la partie UV de la source lumineuse d'excitation.

20 Il est vrai que le comptage des photons individuels en fonction du temps est connu pour la mesure de la radiophotoluminescence dans les dosimètres en verre de métaphosphate (Appl. Phys. A 26, 23 - 26 (1981), mais on prend en compte ici une fréquence d'impul-
25 sions d'excitation peu élevée du laser d'impulsion utilisé, et donc une durée de mesure prolongée, car les propriétés de spectroscopie de fluorescence ne varient pas pendant la période de mesure ; cela signifie que pour l'usage en question, on ne peut pas suivre le déroulement
30 d'une réaction.

L'invention sera mieux comprise en regard des dessins annexés, dans lesquels les figures représentent :

- figure 1 : un exemple de réalisation
35 du dispositif selon l'invention.

- figure 2 : le comptage des photons en fonction du temps.

- figure 3 : le nombre de photons en fonction du nombre de molécules.

5 La figure 1 est un schéma bloc du dispositif. L'échantillon 1 est irradié, dans un volume de mesure d'un ordre de grandeur allant de moins de μl à moins du nl, pour éviter des coûts élevés de substrat dans le cas de protéines de spécificité élevée, et pour
10 améliorer le rapport signal/bruit, au moyen d'un rayon laser pulsé 2. Ce rayon laser 2 est dirigé sur l'échantillon 1 au moyen d'un miroir réflecteur 3 ainsi que d'un filtre d'excitation 4. Les photons de fluorescence 5 arrivent à travers un jeu de filtres d'émission 6, sur
15 un photodétecteur 7, avec un dispositif de mesure électronique 8 adjoint, connu, pour la fluorescence des photons individuels, un corrélateur de temps 9, un analyseur à canaux multiples 10 et un ordinateur 11 pour le contrôle et l'évaluation.

20 Une partie 2' de la lumière d'excitation 2 est déviée par le diviseur de rayon 12 et reçue par la photodiode 13. Son signal de sortie 14 ayant une fréquence correspondant à la récurrence d'impulsions de la lumière de laser 2, est utilisé pour l'obtention d'un
25 signal de référence dans le dispositif électronique de mesure 15, signal qui est utilisé à son tour pour ce qu'on appelle la synchronisation des impulsions d'excitation (lumière 2) et le signal 5 de fluorescence des photons individuels dans le corrélateur de temps 9.

30 L'excitation optique de l'échantillon 1 peut s'effectuer, outre le domaine spectral visible, également dans le domaine UV proche (330-370 nm) de sorte que l'on peut détecter également, entre autres, les bandes d'absorption du méthyl-umbelliféron, du
35 naphтол et du NADPM. Ces fluorophores sont utilisés entre

autres pour la détection des enzymes fréquemment nécessaires, le β -galactosidase et le phosphatase alcalin.

- Pour répondre aux diverses conditions mentionnées plus haut concernant une vitesse d'excitation élevée, on utilise un laser CW (par exemple un laser aux ions d'argon) avec des spécifications UV suffisantes et un mode de couplage actif. La fréquence d'impulsions d'un système de ce type (par exemple 82 MHz) est cependant trop élevée pour la détection électronique (corrélateur 9) et conduit :
- à un comportement d'affaiblissement faussé de la fluorescence,
 - à un échauffement superflu de l'échantillon 1 et ainsi à une perturbation possible de la cinétique enzymatique extrêmement sensible.

- Une réduction de la fréquence des impulsions, avec ce qu'on appelle un "cavity Dumper" (W. Demtröder, "Grundlagen und Techniken der Laserspektroskopie", Springer Verlag, (1977), n'est possible, avec les lasers à UV actuellement disponibles, qu'au moyen d'efforts techniques et financiers très élevés. Au lieu de cela, conformément à l'invention, on utilise un procédé pratique et très économique. La sélection des impulsions s'effectue à l'aide d'un obturateur électro-optique (par exemple une cellule de Pockel à haute fréquence) qui permet une fréquence des impulsions réglable à volonté (par exemple 250 kHz). Sa mise en oeuvre pratique nécessite une synchronisation spéciale. La fréquence de verrouillage de mode (= la moitié de la fréquence des impulsions) du verrouilleur de mode 17 du laser 18 est mesurée de façon électronique et répartie dans un rapport quelconque dans le transducteur 19. Son signal sert alors à commander le générateur d'impulsions rapide 21, dont le signal de sortie 22 est constitué à son tour d'impulsions TTL à longueurs variables (≥ 4 ns) et

retard variable.

Ces impulsions d'excitation 22 servent à déclencher le générateur à haute capacité 23, qui effectue des modifications de tension à court terme sur la cellule de Pockel 16, allant jusqu'à 100 V, et permet une transmission temporaire de la lumière de laser incidente 24 à partir du laser 18. L'optimisation de la longueur et du retard des impulsions de déclenchement 22 permet une connexion et une déconnexion complètes de la tension de la cellule Pockel dans un intervalle de temps qui est plus court que l'écart des impulsions (par exemple 24 ns). Cela permet la sélection des impulsions de laser 2 séparées, à partir d'une série d'impulsions à fréquence élevée (par exemple 82 MHz). Une "post-oscillation" de la tension de cellule Pockel peut être évitée par amortissement au moyen de perles de ferrite et fermeture capacitive appropriée.

Les avantages du procédé de comptage des photons en fonction du temps peuvent être exploités pour les courtes durées de mesure nécessaires en biochimie. Les courbes d'affaiblissement de la fluorescence obtenues d'après la figure 1 (figure 2, une seule représentée) ont été établies en quelques secondes, avec une résolution inférieure à une nanoseconde. L'évaluation du signal de mesure a été effectuée par intégration dans un intervalle de temps déterminé de la courbe d'affaiblissement (par exemple, en figure 2, la courbe supérieure, entre 4,3 ns et 8,8 ns après le maximum), à l'intérieur duquel le fond dû à la lumière d'excitation 2 (courbe inférieure) ainsi que les luminescences perturbatrices de longue durée sont fortement réduits. Cela permet de réduire la quantité de substance minimale détectable de l'échantillon 1 d'environ 10^{-13} mole à environ 10^{-15} mole (avec des volumes allant de l'ordre du μ l jusqu'à moins du μ l) (voir figure 3 : nom-

bre des photons en fonction de la quantité de substance, dans l'exemple du méthyl-umbelliféron).

- Une focalisation de la lumière d'excitation 2 sur un petit volume de mesure permet une réduction du seuil de détection à moins de 10^{-16} mole dans le domaine nl, et à moins de 10^{-18} mole dans le domaine pl. Ainsi, il est possible de détecter une molécule individuelle d'enzyme et d'étudier une cinétique d'enzyme rapide avec une réaction d'environ 3×10^4 molécules fluorogènes par molécule d'enzyme et par minute. Le système de mesure déjà commandé par ordinateur (figure 1) est encore automatisable davantage, et peut être, à cet effet, mis en oeuvre pour des essais de routine dans un large domaine d'application (outre le diagnostic médical, entre autres, également en chimie alimentaire, agriculture, protection de l'environnement).

R E V E N D I C A T I O N S

1°) Dispositif pour la détection quantitativement de réactions biochimiques, en particulier enzymatiques, dans le cas de durées réduites de mesure, avec une détermination de fluorophores naturels et/ou artificiels
5 comme produit réactionnel, le produit réactionnel étant soumis à un rayonnement lumineux et le rayonnement fluorescent dégagé par le produit étant capté et évalué, dispositif caractérisé en ce que : a) l'excitation optique du produit réactionnel s'effectue par impulsions lumineuses, b) il est
10 prévu un comptage des photons en fonction du temps, avec suppression du bruit de fond et une séparation des signaux de mesure de la lumière dispersée et la luminescence perturbatrice, en vertu du comportement d'amortissement en fonction du temps, et c) l'excitation (2, 16-24) et le comptage des
15 photons (5, 7 - 11, 13, 15) sont synchronisés.

2°) Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'excitation optique (3) s'effectue dans le domaine visible et/ou ultraviolet, au moyen d'un laser (17, 18) dont la récurrence élevée d'impulsions (24)
20 peut être réduite par sélection d'impulsions, à l'aide d'un obturateur (16) électro-optique réglable.

3°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il est effectué un comptage individuel des photons.

Fig. 1

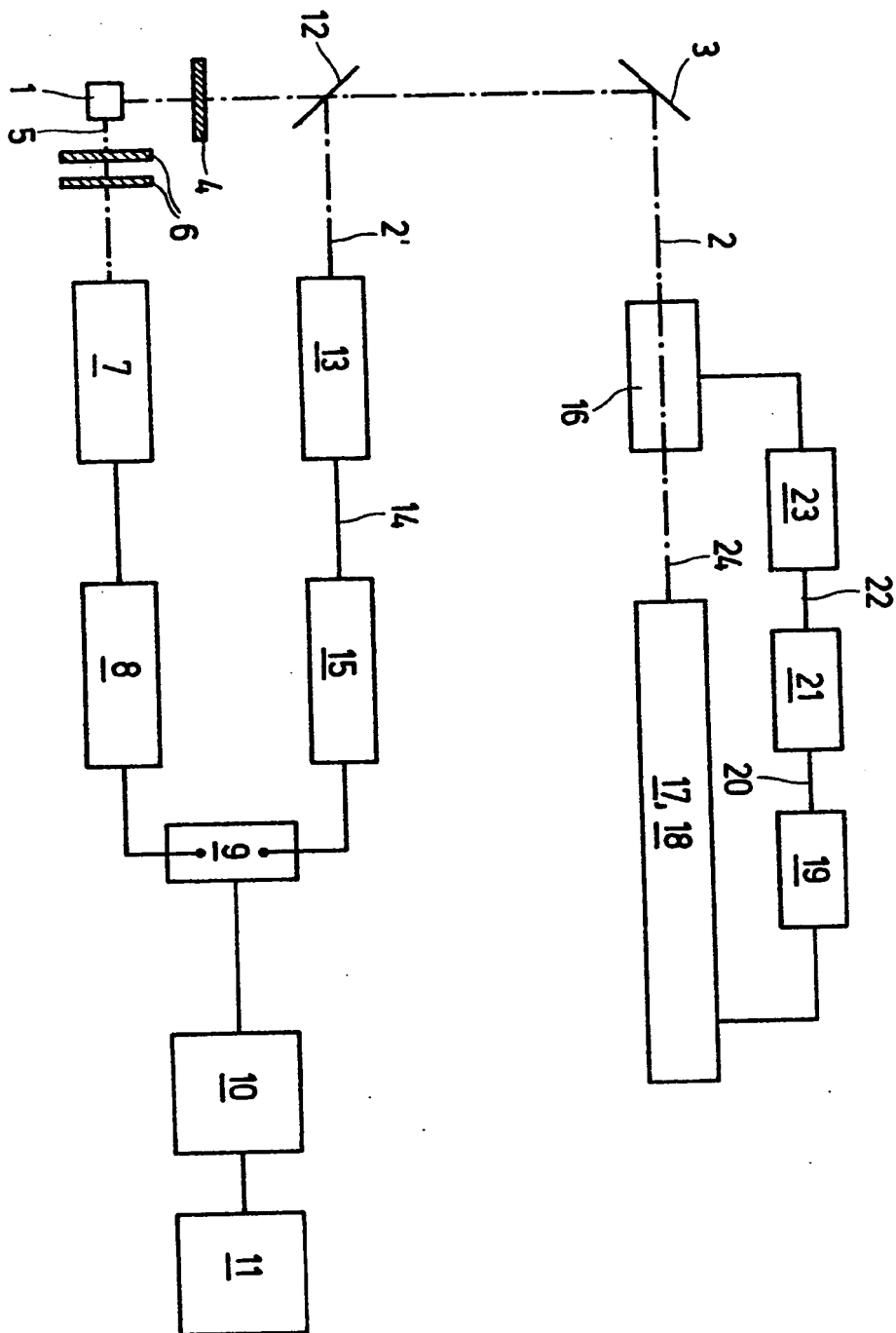


Fig. 2

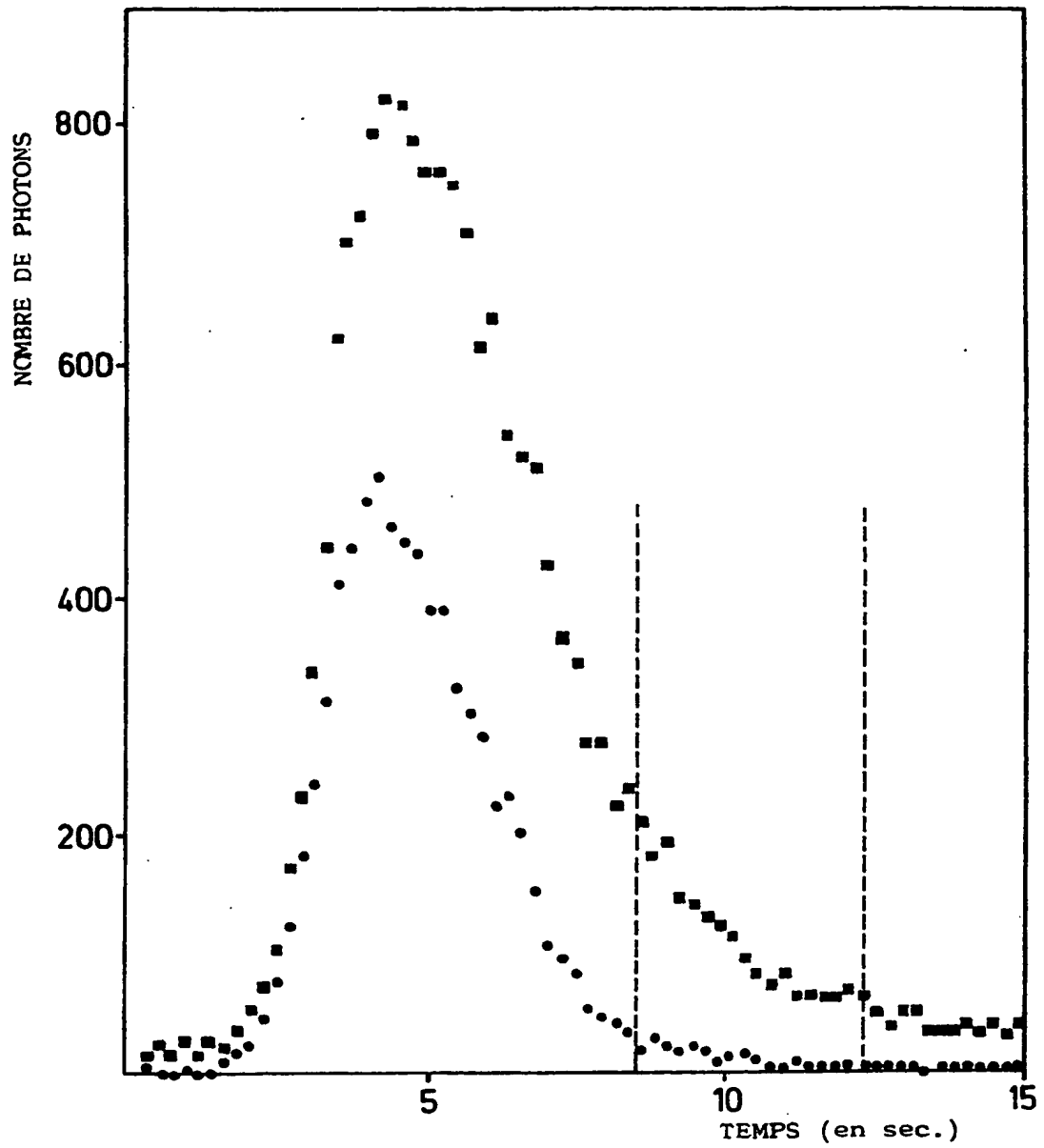


Fig. 3

